利用 RNAi 技术沉默小菜蛾类钙粘蛋白基因

杨中侠[1,2]，吴青君[1]，王少丽[1]，文礼章[2]，徐宝云[1]，张 杰[3]，张友军[1,*]
（1. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所，北京 100081；2. 湖南农业大学生物安全科学技术学院，长沙 410128；
3. 中国农业科学院植物保护研究所，北京 100193）

摘要：RNA 干扰（RNA interference，RNAi）是一种调控基因表达的方法，其通过体外合成一段与内源靶基因同源的双链 RNA（dsRNA）或 siRNA，导入生物体内，使内源靶基因中同源 mRNA 降解，从而达到阻抑基因表达的目的。类钙粘蛋白（cadherin-like protein）是位于昆虫中肠刷状缘膜囊（brush border membrane vesicles，BBMV）上与钙粘蛋白（cadherin）结构相似的物质，是多种昆虫体内 Bt 杀虫蛋白的受体。本研究利用基因特异引物通过 RT-PCR 扩增了小菜蛾类钙粘蛋白基因的 2 个片段（*CAD1* 和 *CAD2*），合成相对应的双链 RNA（double-stranded RNA，dsRNA）；并将 dsRNA 通过显微注射导入小菜蛾 3 龄幼虫体内，测定了不同靶位点、不同剂量、不同检测时间对目的基因 mRNA 表达量的影响。结果表明：将 70 nL CAD1 对应的 dsRNA 注射到幼虫体内 48 h 后，基因表达量显著下降，72 h 后恢复。免疫印迹检测结果表明，类钙粘蛋白在注射 dsRNA 48 h 后幼虫 BBMV 中的含量明显下降。本实验成功实现了小菜蛾类钙粘蛋白基因的沉默，该体系的成功建立为利用 RNAi 技术分析小菜蛾及其他鳞翅目昆虫基因的功能提供了参考。

关键词：小菜蛾；苏云金芽胞杆菌；类钙粘蛋白；RNA 干扰；基因沉默
中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296（2009）08-0832-06

Silencing of cadherin-like gene in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae), using RNAi technique

YANG Zhong-Xia[1,2], WU Qing-Jun[1], WANG Shao-Li[1], WEN Li-Zhang[2], XU Bao-Yun[1], ZHANG Jie[3], ZHANG You-Jun[1,*] (1. Department of Plant Protection, Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 2. Department of Entomology, College of Biosafety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 3. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: RNA interference (RNAi) is the process of sequence-specific post-transcriptional gene silencing initiated by double-stranded RNA (dsRNA) which is homologous in sequence to the silenced gene. The cadherin-like protein, similar to cadherin, lies in brush border membrane vesicles (BBMV) of insect. It had been confirmed to be a receptor of *Bacillus thuringiensis* (Bt) insecticidal protein in several insects. In this study, two cDNA segments (*CAD1* and *CAD2*) encoding the cadherin-like protein gene were cloned through RT-PCR technique using gene specific primers; double-stranded RNA (dsRNA) was synthesized by using the two gene segments respectively, and microinjected into 3rd instar larvae of *Plutella xylostella*; and the effects of different target sites, dose and silencing time on cadherin mRNA expression level were assayed. The results showed that the expression of cadherin-like gene was reduced sharply at 48 h after the dsRNA corresponding to *CAD1* segment was injected and restored at 72 h. The immunoblotting results indicated that cadherin-like protein in BBMV of *P. xylostella* was reduced markedly at 48 h after injection. The cadherin-like gene was silenced successfully in this experiment, and the establishment of RNAi technique can help reveal the gene function of *P. xylostella* including cadherin-like gene.

Key words: *Plutella xylostella*; Bt; cadherin-like protein; RNAi; gene silencing

RNA 干扰（RNA interference，RNAi）是指外源或内源的双链 RNA（double-stranded RNA，dsRNA）特异

基金项目：“973”计划 项目(2006CB102000)；国家自然科学基金项目(30871659)；“863”计划项目 (2007AA10Z421)；农业部行业项目(2008326001)
作者简介：杨中侠，女，1978 年生，黑龙江人，博士，讲师，主要从事昆虫分子生态学研究，E-mail：yzxmichelle@yahoo.com.cn
＊通讯作者 Author for correspondence, E-mail：zhangyj@mail.caas.net.cn
收稿日期 Received：2009-02-04；接受日期 Accepted：2009-06-04

性地引起基因表达沉默的现象。这一现象主要是通过 dsRNA 被一种称为 Dicer 的核酸酶切成大约 21 ~ 25 nt 的干扰性小 RNA 片段(siRNA)，由 siRNA 介导识别并靶向切割同源性靶 mRNA 分子而实现(Misquitta and Paterson, 1999; Zamore *et al.*, 2000; Bernstein *et al.*, 2001; Hammond *et al.*, 2001)。

利用 RNAi 研究基因功能有以下主要特点(Fire *et al.*, 1998)：(1)RNAi 具有很高的特异性，能够特异地降解与之序列相应的单个内源基因的 mRNA，而不影响其他基因的表达(Montgomery *et al.*, 1998)。(2)RNAi 抑制基因表达具有很高的效率，表型可以达到缺失突变体表型的程度；而且相对很少量的 dsRNA 分子(数量远少于内源 mRNA 的数量)就能完全抑制相应基因的表达。(3)RNAi 抑制基因表达的效应可以穿过细胞界限，在不同细胞间长距离传递和维持。(4)使用范围广、高效、低成本。由于 RNAi 能高效特异地阻断基因的表达，因而广泛应用于功能基因的研究。目前已利用 RNAi 技术鉴定了鳞翅目的烟草天蛾 *Manduca sexta*(Levin *et al.*, 2005; Soberón *et al.*, 2007)、斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* (Rajagopal *et al.*, 2002)和棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Sivakumar *et al.*, 2007)等虫体内部分基因的功能。

Vadlamudi 等(1993, 1995)首次在烟草天蛾中肠刷状缘膜囊(brush border membrane vesicles, BBMV)上发现了类钙粘蛋白(cadherin-like protein)，证明其为 Bt 的受体。该类钙粘蛋白可能是细胞快速繁殖和组织生长期间昆虫幼虫中肠上皮组织所必须的物质(Midboe *et al.*, 2003)。目前有多种昆虫中肠的受体类钙粘蛋白已经被分离纯化和测序(Nagamatsu *et al.*, 1998)，至少有两种昆虫的类钙粘蛋白受体的 cDNA 在异源细胞系中成功地进行了表达。Gahan 等(2001)最早报道钙粘蛋白(cadherin)基因受逆转录转座子介导的基因插入是导致烟芽夜蛾对 Cry1Ac 抗性的主要原因，现已基本明确了类钙粘蛋白的突变与昆虫对 Cry1Ac 产生的抗性有关(Morin *et al.*, 2003; Soberón *et al.*, 2007)

本实验选取鳞翅目昆虫小菜蛾为实验材料，设计了小菜蛾类钙粘蛋白基因不同的靶位点并合成相应的 dsRNA，显微注射导入小菜蛾 3 龄幼虫体内，研究了不同靶位点、不同注射剂量和不同检测时间的干扰效果。研究结果有助于阐明类钙粘蛋白在 Bt 受体中的作用，也为利用 RNAi 技术分析小菜蛾及其他鳞翅目昆虫基因的功能提供参考。

1　材料与方法

1.1　供试虫源与寄主植物

1.1.1　供试虫源：DBM1Ac-S：敏感小菜蛾种群，室内饲养多年，期间从未施用过任何杀虫剂。室内饲养温度为 25 ± 1℃，相对湿度为 60% ~ 70%，光周期为 L∶D = 16 h∶8 h。

1.1.2　寄主植物：甘蓝品种：京丰一号，中国农业科学院蔬菜花卉所提供。甘蓝苗长成 6 ~ 8 片叶时，即可供小菜蛾取食。

1.2　实验材料

CrylAc 抗体由中国农业科学院植物保护研究所制备。Trizol Reagent (GICOBRL) Life Teohnologies Total RNA Isolation Reagent 和 RT-PCR 第一链合成试剂盒，购自 Invitrogen 公司(美国, Carlsbad)；pEasy-T1 载体和大肠杆菌 Top10 菌株均购自北京全式金公司(中国，北京)；PCR 产物纯化试剂盒购自北京百泰克生物技术有限责任公司(中国，北京)；MEGAscript RNAi Kit 购自 Ambion 公司(美国，Austin)；Taq 酶购自东胜创新生物技术有限公司(中国，北京)；DNA Marker 为天根公司(中国，北京)产品；蛋白 Marker 为 Amersham Biosciences 公司(英国，Buckinghamshire)产品；辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 购于北京中山生物技术公司(中国，北京)。

1.3　类钙粘蛋白基因片段的克隆

提取小菜蛾 4 龄幼虫中肠总 RNA，用 DNase 处理后进行逆转录，以得到的 cDNA 作模板，根据已克隆的小菜蛾类钙粘蛋白基因全长，设计两段保守序列，一段是位于跨膜区内 745 ~ 773 位氨基酸之间的长为 406 bp 的核苷酸序列，特异性引物(在每条引物的 5′端加上一段 20 bp 的 T7 启动子序列)为 CAD1-F：5′-TAATACGACTCACTATAGGGCTTCGAGATCGACTGG-3′；CAD1-R：5′-TAATACGACTCACTATAGGGGGTTGTAAGTGGTCCG-3′；另一段是长度为 408 bp 的片段，特异引物为 CAD2-F：5′-TAATACGACTCACTATAGGGAGGTCCTGTACTTGTCCG-3′；CAD2-R：5′-TAATACGACTCACTATAGGGGGCAGTCCTCCTTATCC-3′。RT-PCR 扩增条件为：94℃ 5 min，94℃ 30 s，60℃ 30 s，72℃ 1 min，35 循环，72℃ 10 min，产物经测序确认。

1.4　dsRNA 合成

dsRNA 的合成参照 MEGAscript RNAi Kit 试剂盒说明书，于紫外分光光度计在 260 nm 波长检测

dsRNA 浓度，并取 dsRNA 总量的 1/400 于 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其长度，后于 −80℃保存备用。

1.5 dsRNA 注射剂量的确定

选择同一批次内龄期一致、发育良好的 3 龄初的小菜蛾幼虫，用微量操作仪(WPI, Sutter)进行注射。处理注射 dsRNA，对照注射相应体积的高压灭菌水。注射 dsRNA 24，48，72 和 96 h 后，分别比较注射小菜蛾 3 龄幼虫 140，120，100，80，70 和 50 nL dsRNA 的成活率，根据成活率选择最佳的注射剂量。幼虫注射后即放入与 1.1.1 条件相同的培养箱内饲养，每隔 12 h 观察幼虫生长发育状况。

1.6 RNAi 效应的检测方法

1.6.1 半定量 RT-PCR：分别取对照及处理的 3 龄幼虫各 30 头，提取总 RNA，将 DNase 处理后反转录的 cDNA 作为 RT-PCR 的模板。用于 RT-PCR 检测的特异引物分别为：CAD-F1：5′-CTTCGAGATCGACTGG-3′；CAD-R1：5′-GGTTGTAAGTGGTCCG-3′；CAD-F2：5′-AGGTCCTGTACTTGTCCG-3′；CAD-R2：5′-GGCAGTCCTCCTTATCC-3′。

根据已报道的小菜蛾 *actin* 基因序列(AB282645.1)设计一对特异性引物(Actin-F：5′-GCGACTTGACCGACTACCT-3′；Actin-R：5′-GCCGCAAGATTCCATACCC-3′)，作为内参检测，扩增片段为 252 bp。RT-PCR 的扩增条件除循环数改为 22 外，其余条件同 1.3。

根据半定量 RT-PCR 结果，初步确定干扰效果，筛选合适的合成 dsRNA 的基因片段，以用于大量合成 dsRNA，注射后进行蛋白检测。

1.6.2 免疫印迹蛋白检测：参照 Flannagan 等(2005)方法，提取处理及对照组小菜蛾的中肠刷状缘膜囊(BBMV)，用 Bradford 法测定其总蛋白浓度，后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。将待检测的蛋白质样品进行 SDS-PAGE 后用电转仪将蛋白质转移到 PVDF 膜上，将膜在 5% 脱脂奶粉(PBS)中 4℃ 封闭过夜，PBST 洗膜 3 次，每次 5 min，与 CryIAc 毒素 37℃结合 1 h，PBST 洗膜 3 次，每次 5 min，用封闭液稀释好 CryIAc 一抗(1∶1 000)与 PVDF 膜反应，室温下摇床孵育 1 h，重复洗膜步骤，用封闭液按 1∶3 000 稀释辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 37℃温育 1 h，PBS 洗膜 3 次，每次 15 min，将 PVDF 膜置于 DAB 显色液 [DAB 0.012 g，Tris-HCl(0.01 mol/L，pH 7.6) 18 mL，$NiCl_2$(0.3%)2 mL，H_2O_2 20 μL]中，避光显色。标准蛋白质与样品一同进行 SDS-PAGE，转膜后切下，用考马斯亮蓝染色，于凝胶成像系统中观察。

2 结果与分析

2.1 小菜蛾幼虫总 RNA 的提取

小菜蛾幼虫总 RNA 的提取结果见图 1。紫外分光光度计测得 RNA 的 OD_{260}(1.889)/OD_{280}(1.016)比值为 1.926，在 1.8 ~2.0 之间，说明总 RNA 质量合格。

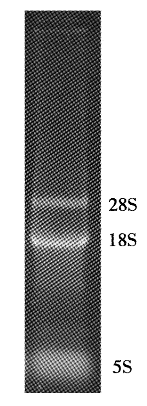


图 1 小菜蛾幼虫总 RNA 提取结果(1% 琼脂糖电泳)

Fig. 1 Electrophoresis of total RNA of *Plutella xylostella* larva (1% agarose)

2.2 用于合成 dsRNA 的 cDNA 的 PCR 扩增结果

PCR 扩增得到清晰的目的带为 446 bp(*CAD1*)和 448 bp(*CAD2*)(含 40 bp 的 T7 RNA 聚合酶启动子序列)(图 2)，片段的长度符合预期片段大小。对该克隆测序之后，通过 NCBI 进行序列分析，确认与钙粘蛋白基因的目的片段区域序列一致，证明此 PCR 体系可以正确扩增所需的片段。以后即按此体系大批量扩增钙粘蛋白片段以用于合成 dsRNA。

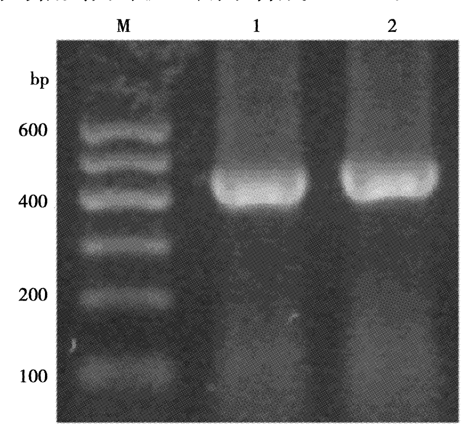


图 2 RT-PCR 扩增小菜蛾幼虫类钙粘蛋白的结果 (1% 琼脂糖电泳)

Fig. 2 Amplification of cadherin-like gene segments of *Plutella xylostella* larva through RT-PCR (1% agarose)

M：100 bp DNA ladder；1：PCR 产物 *CAD1* (PCR product *CAD1*)；2：PCR 产物 *CAD2* (PCR product *CAD2*).

2.3　dsRNA 的制备

按照 RNAi 试剂盒(Ambion)的操作步骤，合成相应的 dsRNA，用 1% 琼脂糖凝胶检测 dsRNA 的大小(图3)，得到清晰的目的带，经分光光度计测定，$OD_{260}=0.34$，$OD_{280}=0.176$，($OD_{260}/OD_{280}=1.93$)，浓度为 1.36 μg/μL。

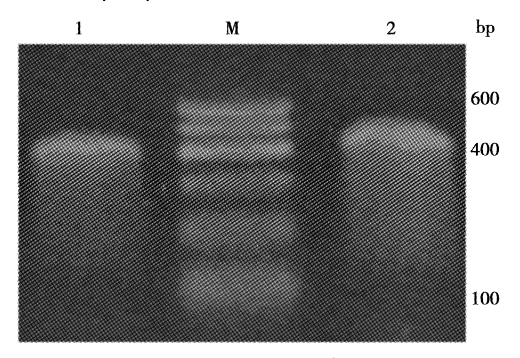


图 3　dsRNA 电泳图

Fig. 3　Electrophoresis of dsRNA

M：DNA Marker Ⅰ；1：*CAD1* 合成的 dsRNA（dsRNA of *CAD1*）；2：*CAD2* 合成的 dsRNA（dsRNA of *CAD2*）.

2.4　dsRNA 注射剂量的确定

在注射后的不同时间段(24，48，72 和 96 h)内，分别比较了注射小菜蛾 3 龄幼虫 140，120，100，80，70 和 50 nL dsRNA 的成活率，结果表明注射剂量严重影响了小菜蛾的成活率，当剂量达到 120 nL 时，小菜蛾的死亡率达到 90% 以上(图 4)；当注射体积超过 70 nL 时，成活率明显下降；而注射 50 nL 时成活率比 70 nL 时稍有提高，但考虑到 dsRNA 的含量和沉默效率，故注射 70 nL 的 dsRNA 为宜。

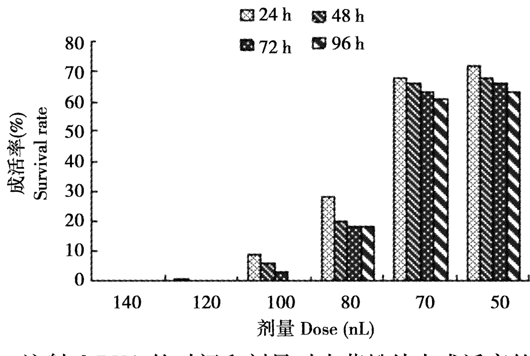


图 4　注射 dsRNA 的时间和剂量对小菜蛾幼虫成活率的影响

Fig. 4　Effects of time and dose of injecting dsRNA solution on the survival rate of *Plutella xylostella* larvae

2.5　RNAi 对小菜蛾幼虫类钙粘蛋白基因 mRNA 表达量的影响

在注射 70 nL dsRNA 24，48，72 h 后，分别提取小菜蛾总 RNA，进行 RT-PCR，22 个扩增循环后，检测钙粘蛋白的 mRNA 表达量，RT-PCR 结果如图 5。

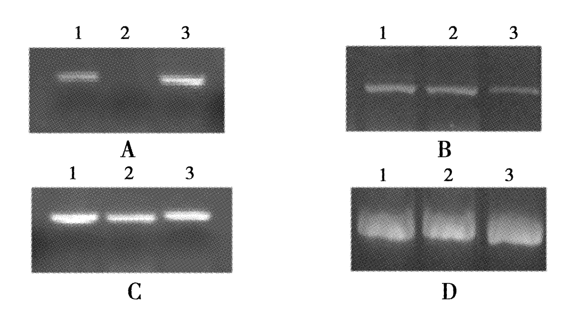


图 5　dsRNA 处理后小菜蛾幼虫类钙粘蛋白 mRNA 的表达量

Fig. 5　Expression of cadherin-like mRNA of *Plutella xylostella* larva after dsRNA treatment

A：注射 *CAD1* 合成的 dsRNA（Injecting dsRNA of *CAD1*）；B：注射 *CAD2* 合成的 dsRNA（Injecting dsRNA of *CAD2*）；C：注射 DEPC 水（Injecting DEPC-treated water）；D：*Actin*．1：注射后 24 h（24 h post-injection）；2：注射后 48 h（48 h post-injection）；3：注射后 72 h（72 h post-injection）.

本次注射所设注射 DEPC 水为对照，结果明显可见对照 Cadherin mRNA 的表达量均正常，说明注射这一操作的影响可以排除。

在注射 *CAD1* 合成的 dsRNA 48 h 后的虫体中，随机抽取 30 头虫检测，发现 Cadherin mRNA 表达量有明显下降；注射 72 h 后，Cadherin mRNA 的表达量则升高；表明注射 dsRNA 已经达到了较为满意的基因沉默效果。而注射 *CAD2* 合成的 dsRNA 在 24～72 h 后的检测中，发现表达量均无差异。说明不同目靶位点合成的 dsRNA 会产生不同的干扰效果，本实验将 *CAD1* 合成的 dsRNA 大量合成，并进行进一步的蛋白检测。

2.6　RNAi 在蛋白水平上对小菜蛾幼虫类钙粘蛋白的影响

注射 dsRNA 48 h 后，提取对照及处理的 BBMV，通过 Bradford 法蛋白定量得到如下标准曲线：$y=0.0006x+0.0168$，$R^2=0.9898$。

将提取的处理及对照的小菜蛾 BBMV 样品，分别与 Cry1Ac 抗体反应，后进行 Western blot 检测。结果如图 6，图中可以看出，被干扰的虫体内类钙粘蛋白与 Cry1Ac 的结合量降低。

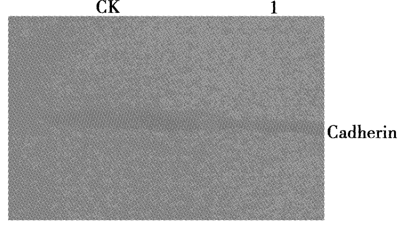


图 6　dsRNA 处理后 Western blot 检测小菜蛾幼虫类钙粘蛋白表达量

Fig. 6　Analysis of cadherin-like protein of *Plutella xylostella* larva after dsRNA treatment by Western blot

CK：对照组 Control；1：处理组 Treatment.

3 讨论

目前对昆虫进行 RNAi 的操作技术已经比较成熟，将 dsRNA 或 siRNA 导入昆虫体内主要有 3 种方法，即注射、饲喂和组织培养。饲喂法即通过饲喂表达 dsRNA 的作物、人工饲料或菌株，使大量的昆虫连续摄入 dsRNA，达到抑制靶基因的目的。但该方法因不能准确定量昆虫摄入的食物及无法建立 RNAi 喂养菌株文库，而不能高效地分析大批基因的功能。组织培养法因培养基的培养条件较难掌握，不易培养出符合要求的细胞而发展较慢。将体外合成的 dsRNA 通过微量操作仪定量注射到昆虫体内，是目前应用最普遍的导入方法（Ober and Jockusch, 2006）。dsRNA 注射到昆虫体内后很容易在体内扩散引起 RNAi，甚至可能将这种效应传递到子代。由于产生的缺陷型外显率高，定量准确，这种方法非常适合基因的功能研究。目前已成功鉴定了鳞翅目的烟草天蛾 *Manduca sexta*（Levin *et al*., 2005；Soberon *et al*., 2007）、斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*（Rajagopal *et al*., 2002）和棉铃虫 *Helicoverpa armigera*（Sivakumar *et al*., 2007）等虫体内部分基因的功能。

RNAi 的效应是整体性的，亦即人工导入足量的外源 dsRNA 会随血淋巴的流动到达虫体各个部位，可在生物体内几乎所有位置都产生 RNAi 现象。本实验用人工合成的 dsRNA 在小菜蛾幼虫中诱发 RNAi，从而抑制其钙粘蛋白基因的表达，结果表明不同靶位点、不同的注射剂量及干扰时间均会影响干扰效果。实验表明注射以类钙粘蛋白基因位于跨膜区 406 bp 片段为靶位点合成的 dsRNA 能有效抑制基因的表达，而另一 408 bp 的片段合成的 dsRNA 则不能引起 RNAi 效应，说明在设计 dsRNA 时存在一定的不确定性，不同的靶位点其抑制效果不同。

有研究表明，达到明显 RNAi 效果所需的 dsRNA 的有效剂量因物种间的差异而不同，有些甚至相差达几个数量级之多。如存在于鞘翅目和鳞翅目昆虫的同一基因，在鞘翅目中达到明显 RNAi 效果的 dsRNA 剂量，用于鳞翅目昆虫则几乎没有效果而必须大幅度加大剂量（Zhuang *et al*., 2008）。究其原因，推测是因不同物种体内的 RNAi 体系、机制有所不同而引起（Arakane *et al*., 2005）。本实验在注射小菜蛾 3 龄 1 日龄幼虫时，在实际操作中，为了尽量减少注射操作对虫体造成的物理损伤，注射 dsRNA 的剂量为 70 nL(0.14 μg/头)，体积过大则导致小菜蛾因伤口损伤而死亡率上升，同时也减轻了过量 dsRNA 对虫体正常发育的影响。

RNAi 的时效性成为很受关注的问题。与饲喂法等其他方法相比，注射法 RNAi 的效果最为直接，因该 dsRNA 可直接进入生物体内随血液循环迅速流遍全身，但由于小菜蛾化蛹后就无法取食，故选择 RNAi 注射的时间点就显得非常重要。类钙粘蛋白为位于小菜蛾中肠的基因，化蛹后就无法对该基因进行 RNAi，龄期太小不易操作，且死亡率加大，故 3 龄第 1 天是最为理想的注射时间点。不同物种 RNAi 应持续的时间也并不相同，确定检测 RNAi 效果的时间点也很重要（Levin *et al*., 2005）。时间过早，可能 RNAi 效应还未开始，导致无法检测到预期的 RNAi 效果；反之，如果时间过久，则 RNAi 效果可能大幅降低，生物体内的 mRNA 已逐渐恢复至正常水平，同样无法有效检测到 RNAi 的效果。本实验在大量重复预实验的基础上，发现在注射后48 h 左右是一个比较理想的分子检测时间点。

RNAi 一直广泛应用于基因功能的研究，在利用该技术成功鉴定了多种昆虫基因功能的同时，科学家们试图将该技术应用于害虫防治领域，目前已在鳞翅目和鞘翅目昆虫中试验成功（Baum *et al*., 2007；Mao *et al*., 2007）。小菜蛾是第一个在田间对 Bt 产生抗性的害虫，并且目前田间已出现了对 Bt 高抗性的小菜蛾种群（Tabashnik, 1994；Griffitts and Aroian, 2005；Sarfraz and Keddie, 2005）。Tabashnik 等(2008)最新的研究发现，美国阿肯色州和密西西比州的美洲棉铃虫田间种群也已对转 Bt 基因棉产生了抗药性，这也是国际上首次报道害虫田间种群对转 Bt 基因植物的抗药性。害虫对 Bt 的抗性水平达到一定程度时，无论是天然的 Bt 制剂，经过遗传改良的 Bt 工程菌，还是转 Bt 基因的农作物都将变得毫无意义，其损失将是不可估量的（Soberón *et al*., 2007）。因此，研究小菜蛾 Bt 受体的功能对于防治小菜蛾具有十分重要的意义，已有的实验结果表明，注射 dsRNA 后小菜蛾的幼虫死亡率和性比增加，而繁殖力、产卵率、蛹重、羽化率和雌雄成虫寿命则减小（Yang *et al*., 2008）。本实验针对小菜蛾成功建立了 RNAi 体系，结果证明了利用 RNAi 技术可沉默小菜蛾的类钙粘蛋白基因，该结果为研究小菜蛾类钙粘蛋白的功能提供了依据，相关的研究方法还为研究其他昆虫的基因功能提供了依据。

参 考 文 献（References）

Arakane Y, Muthukrishnan S, Kramer KJ, 2005. The *Tribolium* chitin synthase genes *TcCHS1* and *TcCHS2* are specialized for synthesis of epidermal cuticle and midgut peritrophic matrix. *Insect Mol. Biol.*, 14(5): 453－463.

Baum JA, Bogaert T, Clinton W, Heck GR, Feldmann P, Ilagan O, Johnson S, Plaetinck G, Munyikwa T, Pleau M, Vaughn T, Roberts J, 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat. Biotechnol.*, 25(11): 1 322－1 326.

Bernstein E, Caudy AA, Hammond SC, 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6 818): 363－366.

Fire A, Xu S, Montgomery M, Kostas S, 1998. Potent and specific genetic interference mediated by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391: 806－811.

Flannagan RD, Yu CG, Mathis JP, Meyer TE, Shi XM, Siqueira AA, Siegfried BD, 2005. Identification, cloning and expression of a Cry1Ab cadherin receptor from European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Crambidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35(1): 33－40.

Gahan LJ, Gould F, Heckel DG, 2001. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science*, 293(5 531): 857－860.

Griffitts JS, Aroian RV, 2005. Many roads to resistance: How invertebrates adapt to Bt toxins. *BioEssays*, 27(6): 614－624.

Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ, 2001. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat. Rev. Genet.*, 2(2): 110－119.

Levin DM, Breuer LN, Zhuang S, Anderson SA, Nardi JB, Kanost MR, 2005. A hemocyte-specific integrin required for hemocytic encapsulation in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35(5): 369－380.

Mao YB, Cai WJ, Wang JW, Hong GJ, Tao XY, Wang LJ, Huang YP, Chen XY, 2007. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nat. Biotechnol.*, 25: 1 307－1 313.

Midboe EG, Candas M, Bulla LA Jr, 2003. Expression of a midgut-specific cadherin BT-R1 during the development of *Manduca sexta* larva. *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.*, 135(1): 125－137.

Misquitta L, Paterson BM, 1999. Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNAi): a role for nautilus in embryonic somatic muscle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(4): 1 451－1 456.

Montgomery MK, Xu SQ, Fire A, 1998. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(26): 15 502－15 507.

Morin S, Biggs RW, Sisterson MS, 2003. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(9): 5 004－5 009.

Nagamatsu Y, Koike T, Miyoshi Y, Shigematsu S, Kogure M, 1998. Cloning, sequencing, and expression of the *Bombyx mori* receptor for *Bacillus thuringiensis* insecicidal CryIA (a) toxin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62(4): 727－734.

Ober KA, Jockusch EL, 2006. The roles of wingless and decapentaplegic in axis and appendage development in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Dev. Biol.*, 294(2): 391－405.

Rajagopal R, Sivakumar S, Agrawal N, Malhotra P, Bhatnagar RK, 2002. Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *J. Biol. Chem.*, 277(49): 46 849－46 851.

Sarfraz M, Keddie BA, 2005. Conserving the efficacy of insecicides against *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Appl. Entomol.*, 129(3): 149－157.

Sivakumar S, Rajagopal R, Venkatesh GR, Srivastava A, Bhatnagar RK, 2007. Knockdown of aminopeptidase-N from *Helicoverpa armigera* larvae and in transfected Sf21 cells by RNA interference reveals its functional interaction with *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein Cry1Ac. *J. Biol. Chem.*, 282(10): 7 312－7 319.

Soberón M, López LP, López I, Gómez I, Tabashnik BE, Bravo A, 2007. Engineering modified Bt toxins to counter inect resistance. *Science*, 318(5 856): 1 640－1 642.

Tabashnik BE, 1994. Evolution of resisance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.*, 39: 47－79.

Tabashnik BE, Gassmann AJ, Crowder DW, 2008. Insect resistance to Bt crops: Evidence *versus* theory. *Nat. Biotechnol.*, 26: 199－202.

Vadlamudi RK, Ji TH, Bulla LA Jr, 1993. A specific binding protein from *Manduca sexta* for the inecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner*. *J. Biol. Chem.*, 268(17): 12 334－12 340.

Vadlamudi RK, Weber E, Ji I, Ji TH, Bulla LA Jr, 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.*, 270(10): 5 490－5 494.

Yang ZX, Wen LZ, Wu QJ, Wang SL, Xu BY, Chang XL, Zhu GR, Zhang YJ, 2009. Effects of injecting cadherin gene dsRNA on growth and development in diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Appl. Entomol.*, 133(2): 75－81.

Zamore PD, Tuschl T, Shar PPA, Bartel DP, 2000. RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 101(1): 25－33.

Zhuang SF, Lisha K, James BN, 2008. Multiple alpha subunits of integrin are involved in cell-mediated responses of the *Manduca* immune system. *Dev. Comp. Immunol.*, 32(4): 365－379.

（责任编辑：邓艳）